

Sección de Fisiología Animal del Instituto de Biología Aplicada
(Prof. F. Ponz)

Fosfatasas digestivas en los anfibios

1.^a comunicación: pH óptimo y distribución en *Rana esculenta*

FRANCISCO PONZ

Introducción

Se ha investigado el contenido del tubo digestivo de diversos mamíferos en fosfatasas alcalinas; una revisión de la bibliografía se puede encontrar en un trabajo de LÓPEZ NAVARRO (1). Hay determinaciones aisladas en el aparato digestivo de otros animales; recientemente DRILHON y BUSNEL (2) han estudiado las fosfatasas de los tubos de Malpighi y del intestino de una serie de insectos. Hemos querido contribuir a rellenar las lagunas existentes en este capítulo de la Bioquímica comparada, aportando datos sobre *Rana esculenta*.

En esta primera comunicación nos limitaremos a estudiar la distribución de las fosfatasas alcalinas en las diferentes partes del tubo digestivo y el contenido de éste en relación con el riñón. Investigamos previamente el pH óptimo para la acción del fermento.

Material y métodos

Se han utilizado ejemplares de *Rana esculenta*, mantenidos en los acuarios del Laboratorio, con un peso de 12 a 22 gr.

Sacrificado el animal se extraía todo el tubo digestivo y se arrasaba su contenido con solución isotónica de ClNa; deslizando suavemente los dedos a su largo, se hacía fluir ésta enteramente. Se dividía en los trozos convenientes y las muestras se llevaban a pesar en cámara húmeda. Trituradas en mortero, se autolizaban en 10, 20, 25, 50 ó 100 veces su peso de agua clorofórmica; según los casos, durante 22 horas, a la temperatura ambiente. Tras este tiempo se filtraba por algodón. En el filtrado turbio se recoge casi toda la actividad fosfatásica del tejido de procedencia. (KAY, 3.)

La determinación de fosfatasas se ha hecho con glicerofosfato

sódico como sustrato y con soluciones amortiguadoras de acetato-veronal de Michaelis y glicocola-sosa de Sørensen, con hidrólisis a 37° durante una hora, siguiendo la técnica de SOLS (4). Para determinar el fósforo inorgánico utilizamos la reacción del azul de molibdeno aplicando también el sistema de cálculo colorimétrico de SOLS (5).

Expresamos los resultados en mg. de P liberados por gramo de tejido fresco.

Resultados

1. *Óptimo de pH*

Los óptimos de pH encontrados para las fosfatasa intestinales de mamíferos e insectos están entre 9 y 10 aproximadamente.

Para las ranas, hemos probado la actividad fosfatásica de autolizados de intestino en 25 veces su peso de agua clorofórmica (48 horas a la temperatura ambiente), determinando la hidrólisis del glicerofosfato durante dos horas a 37°, con pH comprendidos entre 4 y 12, ambos inclusive.

Para pH comprendidos entre 4 y 9,4 utilizábamos soluciones amortiguadoras de acetato-veronal de Michaelis; para los pH entre 9 y 12, las de glicocola-sosa de Sørensen.

A continuación se expresan los resultados obtenidos.

pH:	4	5	6	7	8	9	9,4	10	10,5	11	12
mg. P/g.											
intestino fresco:	2,0	3,3	5,3	8,4	9,1	14	20,0	18,8	14,5	7,8	2,1

Se comprueba con ello que en *Rana esculenta* el pH óptimo de las fosfatasa intestinales es del mismo orden que los encontrados en otros animales. El óptimo en la serie realizada está en pH 9,4. Las experiencias sucesivas se hicieron siempre a ese pH.

2. *Distribución*

Una serie de determinaciones se hizo tomando una muestra de esófago, el estómago entero, las primera y segunda mitades de intestino, la cloaca y un riñón de cada animal, por separado. Se autolizó el intestino y la cloaca a 50 veces su peso; el esófago y estómago a 10 ó 20 veces y el riñón a 100 veces su peso fresco. Los resultados pueden verse en la tabla I.

TABLA I

Actividad fosfatásica (mg. de P/g tejido fresco) de diferentes órganos digestivos y de riñón de Rana esculenta

Rana núm.	Peso g	Esófago	Estómago	1.ª mitad	Intestino 2.ª mitad	Cloaca	Riñón
1	21	0,17	0,21	2,42	2,05	1,37	37,5
2	14	0,42	0,38	4,05	2,50	0,85	21,5
3	14	0,25	0,45	3,40	3,15	0,70	16,2
4	19	0,69	0,52	5,95	3,40	2,05	34,3
5	16	0,33	0,37	2,10	1,35	0,93	25,0
6	18	0,41	0,29	3,80	2,15	1,45	23,4
Medias		0,38	0,37	3,62	2,43	1,22	26,3

Claramente se ve que el esófago y estómago poseen sólo muy escasa actividad fosfatásica, mientras al intestino corresponden las cifras más altas del tubo digestivo. La cloaca no está enteramente desprovista de fosfatasa. Todos los valores del tubo digestivo están muy por bajo de los encontrados en el riñón.

Hemos querido precisar más la distribución de fosfatasas a lo largo del intestino. Hay diferencias en las distintas especies animales: conejo y gato tienen máximos en yeyuno (KAY, 3); en el hombre es quizá ligeramente más alta en el íleon. En ratas, WESTENBRINK (6), nosotros (7) y últimamente LÓPEZ NAVARRO (l. c.) en ratas y cobayos, se ha seguido el curso de la actividad fosfatásica en las distintas zonas del intestino, encontrando un máximo en yeyuno a 1/6 aproximadamente de la longitud total del intestino, a partir del píloro.

Dividimos el intestino de cada rana en cuatro partes iguales y trituramos juntas las correspondientes de cuatro animales al objeto de tener autolizado suficiente para determinar bien el fósforo inorgánico antes y después de la hidrólisis. De los mismos animales trituramos juntos una muestra de esófago, el estómago y la cloaca.

TABLA II

Distribución de las fosfatasas alcalinas a lo largo del tubo digestivo (mg. de P liberados por gramo de tejido fresco)

Ranas	Peso	Esófago	Estómago	Cuartas partes de intestino				Cloaca
				1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	
7	12,5	0,6	0,5	4,5	3,8	3,3	1,4	1,2
8	13,5							
9	21,0							
10	19,0							

Como se ve en la tabla II, la máxima riqueza corresponde a la porción más próxima al píloro, es decir, la primera parte del intestino delgado. Luego, va cayendo la actividad fosfatásica hasta un mínimo en el intestino final y en la cloaca.

3. Relación Riñón/Intestino

Es interesante la diferencia observada en el contenido intestinal y renal de fosfatasas, si se tienen en cuenta los datos de mamíferos. En *Rana esculenta* el riñón es unas siete u ocho veces más rico que el intestino; en la rata ocurre lo contrario: el intestino posee más fosfatasa alcalina que el riñón. Quisiéramos comprobar los datos de la rata que adjuntamos comparativamente a los encontrados en rana. En la tabla III se incluye el resultado de las determinaciones, refiriéndose como intestino de rata los valores de la primera mitad de yeyuno y en la rana la primera porción del intestino delgado:

TABLA III

Relación comparada de contenido de fosfatasas alcalinas de riñón a intestino en Mus norvegicus (albinus) y Rana esculenta

Animal	Peso	Intestino	Riñón	Riñón-Intestino
Rata 1	153	88	33	0,36
" 2	162	100	21,9	0,22
Rana	Medias (Tabla I)	3,62	26,3	7,

Mientras los valores de riñón son semejantes, los de intestino de rana son 20 o 30 veces menores. Esta diferencia no puede atribuirse a la distinta riqueza en agua en las dos especies animales: en rata el agua supone en intestino y riñón un 79 y un 76 %, respectivamente, según hemos comprobado. En la rana las cifras no son muy distintas: 81 y 77 %, para intestino y riñón.

Queda así establecida una considerable diferencia de comportamiento bioquímico entre la rata y la rana, cuya explicación se intentará en trabajos sucesivos.

Resumen

Se estudian las fosfatasas alcalinas del tubo digestivo de *Rana esculenta*. El pH óptimo encontrado es 9,4. Esófago y estómago tienen muy poca actividad fosfatásica; algo más posee la cloaca. El máximo contenido se encuentra en la primera porción del intestino (3 a 6 mg de P por g de tejido fresco). A lo largo del intestino va decreciendo, a partir del píloro, siendo mínimo en el intestino final y cloaca.

La relación de fosfatasas alcalinas riñón/intestino es alrededor de 7, mientras en la rata se encuentran valores de 0,2 a 0,3; está, pues, fuertemente invertida, debido a la mucha menor actividad fosfatásica del intestino de rana; en riñón se encuentran cifras sensiblemente iguales en ambos vertebrados.

Summary

We study the alkaline phosphatases of the alimentary canal of the *Rana esculenta*. The optimum pH found is 9,4. Esophagus and stomach have a very little phosphatasic activity; the cloaca possesses some more. The maximum contents is found in the first portion of the intestine (3 to 6 mg. of P per g. of fresh tissue). Through the long of intestine decreases from the beginning of pilorous, being the minimum of the end of intestine and cloaca.

The relation of alalin phosphatases kidney/intestine is around 7, whilst in the rat are found values of 0,2 to 0,3: it is therefore strongly inversed, own to the smallest phosphatasic activity of frog intestine; in the kidney are found sensibly similar values in both vertebrates.

Résumé

L'on étudie les phosphatases alcalines du tube digestif de la *Rana esculenta*. Le pH optimum trouvé est de 9,4. L'œsophage et l'estomac montrent une très faible activité phosphathasique; un peu plus grande la cloaque. Le maximum contenu se trouve dans la première partie de l'intestine (3 à 6 mg de P par g de tissu

frais). Tout au long de l'intestin va en décroissant à partir du pilor, étant minimum dans l'intestin final et cloaque.

La relation de phosphatases alcalines reins/intestin est d'environ de 7, pendant que chez le rat l'on trouve des valeurs de 0,2 à 0,3 : elle est, donc, fortement inversée, du à la beaucoup plus petite activité phosphatasique de l'intestin de la grenouille ; dans le rein l'on trouve des chiffres sensiblement égales dans ces deux vertébrés.

Zusammenfassung

Es werden die alkalischen Phosphatasen des Verdauungskanals der *Rana esculenta* untersucht. Das optimale pH, Ösophagus und Magen haben eine sehr niedrige phosphatasische Aktivität. Etwas mehr besitzt die Kloake. Der grösste Gehalt wird in dem ersten Teil des Darmes festgestellt (3 bis 6 mg P pro g frischen Gewebe). Vom Pylorus abwärts wird er immer geringer und ist im Darmende und Kloake minimal.

Das Verhältnis der alkalischen Phosphatasen Niere/Darm ist ungefähr 7, während bei der Ratte Werte von 0,2-0,3 gefunden werden ; es ist also sichtbar ein Umgekehrtes, was durch die viel niedrigere phosphatasische Aktivität des Froschdarms bedingt ist. In der Niere werden bei beiden Vertebraten praktisch dieselben Werte gefunden.

Bibliografía

1. LÓPEZ NAVARRO, J. — Tesis doctoral, 1946 (en publicación).
2. DRILHON y BUSNEL. — Bull. Soc. Chem. biol., 27, 415, 1945.
3. KAY, H. D. — Biochem. J., 22, 855, 1928.
4. SOLS, A. — Tesis doctoral, 1946 (en publicación).
5. SOLS, A. — R. Esp. Fisiol., 1, 355, 1945.
6. WESTENBRINK, H. G. K. — Arch. Néerl. Physiol., 21, 18, 1936.
7. PONZ, F. — R. Esp. Fisiol., 1, 173, 1945.